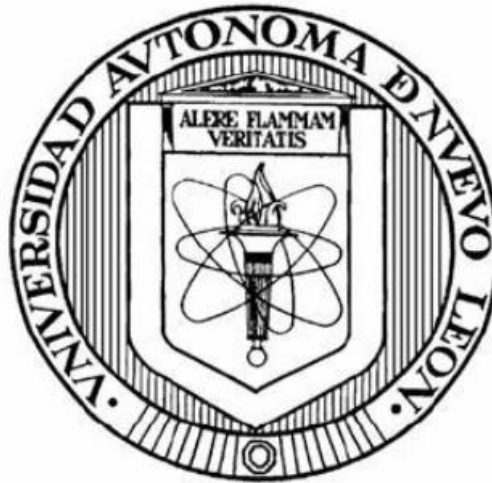


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“TERAPIA GÉNICA ANTIOXIDANTE USANDO EL GEN
PEROXIRREDOXINA 3 EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON”**

POR

M.C.P. ESROM JARED ACOSTA ESPINOZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

OCTUBRE, 2018

**"Terapia génica antioxidante usando
el gen Peroxirredoxina 3 en un modelo de la enfermedad de Parkinson."**

Aprobación de tesis:



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



Dra. Aracely García García
Codirector



Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirección de Estudios de Posgrado

**"Terapia génica antioxidante usando
el gen Peroxirredoxina 3 en un modelo de la enfermedad de Parkinson."**

Presentado por

M.C.P. Esrom Jared Acosta Espinoza

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la co-dirección de la Dra. Aracely García García.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



Dra. Aracely García García
Codirector

*“Sólo podemos ver poco del futuro, pero lo suficiente
para darnos cuenta de que hay mucho que hacer”*

A. M. Turing



*A mi madre que me sostiene siempre
A mi hermano, mi super héroe favorito
Y a ti, que creíste en mi cuando yo no lo hice.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar por agradecer al pilar más importante de mi formación profesional y humana, mi bella familia, que a pesar de todas las adversidades y obstáculos a lo largo del camino supieron mostrarme tierra cuando estaba lejos de ella. A mi madre, a mi hermano, a mi padre, a mi abuela y a mi tía y prima.

Especialmente quiero agradecer a la Dra. Odila Saucedo Cárdenas, quien me hizo enamorarme de la ciencia desde esa primera clase de biología celular en mi primer año de medicina hace ya casi 10 años, que me ha apoyado firmemente a través de mi carrera médica y durante esta etapa de ella, por abrirme las puertas de su laboratorio y ofrecerme un lugar en el. De igual manera gracias por el apoyo en mi vida personal con su inigualable forma de ver la vida y sus sabios consejos. Gracias por tantas charlas y lecciones aprendidas.

A la Dra. Aracely García García por sus consejos, enseñanzas e interminable paciencia a través de esta etapa académica.

Al Dr. Humberto Rodríguez Rocha por formar parte de mi comisión y sus consejos en la realización de esta tesis.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por las oportunidades brindadas y todo su conocimiento.

A las personas de ambos laboratorios que siempre supieron como ayudarme, en especial a Sheila, que sin ella este trabajo no hubiese sido posible, con su brillante mente y su inigualable forma de ser, a la Dra. Laura por siempre conocer los trucos para tantas cosas, a Naty por las sonrisas y la ligereza del tiempo, a Erick por la ayuda en todo lo que la palabra implica.

De igual forma a Aby, David, Leyla, Ale, José Juan, Saúl, Ernesto, Daniel, Dra. Marichu, Dr. Arnulfo y al resto de las personas involucradas.

A mis amigos, en especial a Mario, David e Isabel, que estuvieron de formas distintas involucrados en este proceso y me apoyaron desde donde quiera que estuvieran, a Héctor, que me ayudó a entender mil cosas aún más complejas acerca de mí mismo y a ver lo que yo mismo no podía.

Al resto de mis amigos involucrados y a ti que estas leyendo esto, como un salto en el futuro prediciendo que todo estará bien y mejor.

Gracias al CONACyT por el apoyo económico brindado a través de la beca para la realización de esta maestría, a la UANL por medio de su Facultad de Medicina, por ser mi casa durante todo este tiempo. A mis maestros y personal del departamento de Histología.

Y a mí mismo, que, a pesar de todo, seguí adelante;

Resumen

M.C.P Esrom Jared Acosta Espinoza
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Noviembre 2018

Título del Estudio: "Terapia génica antioxidante usando el gen Peroxirredoxina 3 en un modelo de la enfermedad de Parkinson."

Páginas del estudio: 52

Área del estudio: Morfología

**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias
con Orientación en Morfología**

Propósito y Método del estudio

Las enfermedades neurodegenerativas representan un gran problema de salud a nivel mundial, entre ellas se encuentra la Enfermedad de Parkinson (EP), para la cual actualmente no existe una terapia efectiva contra los procesos neurodegenerativos. Existen factores genéticos y ambientales que ocasionan una disfunción a nivel mitocondrial debido a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionando un estrés oxidativo y una disminución marcada de la proteína Peroxirredoxina 3 (PRX3), PRX3 se encarga de mantener el equilibrio de ROS a nivel mitocondrial, ocasionando una alta susceptibilidad al estrés oxidativo en la ya vulnerable sustancia nigra (SN) sumada a una baja expresión de PRX3 en esta área. Una de las estrategias para aumentar la expresión de PRX3 en SN es la terapia génica.

Nuestro grupo ha desarrollado un sistema de entrega de ADN que incluye el péptido RVG mutante (RVG29m), el cual ha demostrado poseer una buena eficiencia para el envío de moléculas de DNA tanto a células de fenotipo neuronal como diferentes tipos celulares *in vivo*. El propósito de este estudio fue evaluar una terapia génica antioxidante utilizando el gen de la PRX3 en un modelo de la EP. El péptido RVGm y un plásmido que codifica el gen PRX3 fusionado a la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), como gen reportero, se unieron mediante cargas electrostáticas opuestas para formar el complejo RVGm-PRX3. Se formaron los complejos y se analizó la relación óptima de los componentes mediante geles de agarosa de retención. Después de esto se confirmó la expresión del gen PRX3 en células de fenotipo neuronal por medio de transfección con los complejos, además de mediante el uso de un reactivo comercial. El complejo RVGm-PRX3 se inyectó por medio de cirugía estereotáxica en el cuerpo estriado en ratones de la cepa C57BL6. Posteriormente, se indujo el modelo de la EP mediante la administración de Paraquat (PQ) dos veces por semana, durante 6 semanas. Los ratones, después de la última inyección con PQ, se evaluaron para determinar la función motora y cognitiva, al término de la evaluación se sacrificaron y sus cerebros se prepararon para análisis histológicos.

Conclusiones y contribuciones

El complejo RVGm-PRX3 es eficiente como vehículo para la entrega del gen PRX3 *in vitro* e *in vivo*, mejora la función motora y cognitiva en un modelo animal de la EP y es capaz de proteger contra la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SN inducida por PQ.



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Director

Índice

1. Introducción.....	15
2. Antecedentes	16
2.1. Enfermedades Neurodegenerativas	16
2.2. Enfermedad de Parkinson.....	16
2.3. Estrés oxidativo.....	17
2.4. Peroxirredoxinas	18
2.5. Peroxirredoxina 3 y su relación con trastornos neurodegenerativos.....	19
2.6. Entrega Terapéutica.....	20
2.7. Péptidos con Capacidad de Penetración Celular (CPPs)	21
2.8. Glucoproteína del Virus de la Rabia (RVG)	22
2.9. Modelo de la enfermedad de Parkinson utilizando plaguicidas	23
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivo General.....	24
6. Objetivos específicos.....	24
7. Materiales y equipo	24
7.1. Material Biológico.....	24
7.1.1 Péptidos	24
7.1.2 Animales.....	25
7.1.3 Anticuerpos	25
7.1.4 Línea celular	25
7.2. Soluciones	25
7.3. Equipo de laboratorio	26
7.4. Consumibles	27
7.5. Equipo para pruebas.....	28
8. Estrategia General.....	28

9.	Metodología científica.....	29
9.1.	Cultivo y transfección celular.....	30
9.2.	Tratamiento de cubreobjetos con APTES	31
9.3.	Inmunofluorescencia <i>in vitro</i>	31
9.4.	Cirugía Estereotáxica.....	31
9.5.	Modelo animal de la EP	32
9.6.	Evaluación de la función motora y cognitiva.....	32
9.7.	Obtención de los tejidos	33
9.8.	Inmunofluorescencia	33
9.9.	Análisis estadístico.....	33
10.	Resultados	34
10.1.	Relación óptima para la formación del complejo RVG29m-PRX3.	34
10.2.	Expresión de GFP y PRX3 en células de fenotipo neuronal.....	35
	35
10.3.	El péptido de penetración celular RVGm es capaz de internalizar el plásmido PRX3-GFP en células dopaminérgicas.....	36
10.4.	El complejo RVGm-PRX3 disminuye el deterioro en la función motora y cognitiva ocasionado por el paraquat.....	36
10.5.	PRX3 protege contra la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SN inducida por Paraquat.....	42
11.	Discusión.....	43
12.	Conclusiones.....	46
13.	Bibliografía	47

ABREVIATURAS

Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
6-OHDA	6-hidroxidopamina
Aa	Aminoácidos
AAV	Virus Adenoasociados (por sus siglas en inglés)
AP	Anteroposterior
AChR	Receptor acetilcolina
BHE	Barrera hematoencefálica
Col	Colaboradores
CPPs	Péptidos con capacidad de penetración celular (por sus en inglés)
DAPI	4',6-Diamida-2-fenidol
DAergic	Neuronas dopaminérgicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés DNA)
DV	Dorsoventral
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ENG's	Enfermedades neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
EO	Estrés oxidativo
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína (por sus siglas en inglés)
GDNF	Factor neurotrófico de la línea celular glial
GFP	Proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés)

GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
GP	Glutación Peroxidasa
h	Hora
H ₂ O	Agua
i.p.	Intraperitoneal
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
IHQ	Inmunohistoquímica
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
KP	Péptido cariofílico (por sus siglas en inglés)
lb	libra (siglas en inglés)
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ML	Mediolateral
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos
ng	Nanogramo
p<	Grado de significancia
pADN	ADN plasmídico
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PFA	Paraformaldehído
PRX3	Peroxirredoxina 3
PQ	Methylviologenhydrate 98% organics (Paraquat)

RVG29	Péptido de la glucoproteína del virus de la rabia
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
siRNA	ARN pequeños de interferencia (por sus siglas en inglés)
SFB	Suero fetal bovino
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
TH	Tirosina hidroxilasa (por sus siglas en inglés)
TAE	Tris-acetato-EDTA (buffer)
U	Unidades
VTA	Área tegmental ventral
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µm	Micrómetro

Introducción

1. Introducción

El envejecimiento o senescencia se define como el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que le ocurren a los seres vivos a consecuencia del paso del tiempo.

Se estima que la población mundial actual circa los 7.6 mil millones de personas, y aproximadamente 617 millones son mayores de 60 años. Se calcula que en los próximos 50 años más de un cuarto de la población forme parte de este grupo etario (He, Goodkind, & Kowal, 2016).

Según datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el promedio de vida del ser humano se ha incrementado hasta los 73 años, esto conlleva de igual forma al aumento de la prevalencia de enfermedades crónico degenerativas, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas (ENGs), pues el tejido nervioso es uno de los más susceptibles al paso de los años. Entre estas enfermedades destaca la Enfermedad de Parkinson (EP).

El estudio de las ENGs ha logrado grandes avances en su etiología, sintomatología, diagnóstico y en las regiones del sistema nervioso central (SNC) que se encuentran afectadas. Sin embargo, su tratamiento es el reto más difícil, ya que las terapias existentes, tanto farmacológicas como quirúrgicas son paliativas y hasta la fecha ninguna ha resultado efectiva para detener el proceso neurodegenerativo (Lees, Hardy, & Revesz, 2009).

Una posible alternativa de tratamiento, y que recientemente ha sido tema de numerosos estudios es la transferencia de moléculas terapéuticas con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes hacia las regiones afectadas del cerebro con resultados muy prometedores.

La terapia génica para el tratamiento de las ENGs está basada en la expresión de genes terapéuticos en los diferentes tipos celulares afectados del sistema nervioso central (SNC). La patogenia de las ENGs es diversa, una de las principales causas es el estrés oxidativo debido al aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células nerviosas. Una de las metas en terapia génica para ENGs es expresar genes cuya función permita restaurar la homeostasis de este sistema, mediante el aumento de defensas antioxidantes (Uttara, Singh, Zamboni, & Mahajan, 2009).

En el presente trabajo, nuestra estrategia consiste en entregar el gen de la Peroxirredoxina 3 (*PRX3*) a nivel de la SN mediante el uso de péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs), específicamente con el péptido RVGm en un modelo de la EP.

2. Antecedentes

2.1. Enfermedades Neurodegenerativas

Las ENGs se encuentran asociadas al inevitable proceso de envejecimiento. Las ENGs son la causa de más de la mitad de las consultas en los servicios de neurología alrededor del mundo, por lo que conllevan a un gran impacto económico, laboral y social. En Estados Unidos de América se diagnostican más de 50,000 casos anuales tan solo de enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedad de Alzheimer (EA) (National-Parkinson-Foundation, 2017).

Las ENGs se caracterizan por la pérdida de neuronas dentro del SNC, por su etiología multifactorial y por la ausencia de terapias efectivas que detengan la progresión de la enfermedad. Sus características clínicas dependen mucho de la región del SNC que se vea comprometida. Las dos ENGs más frecuentes y de gran importancia debido al grado de discapacidad que producen son la EA en primer lugar seguida de la EP. Dentro de su patogénesis se involucran distintos mecanismos moleculares como apoptosis, procesos inflamatorios con la posterior participación activa de la microglía y los astrocitos, una disfunción axonal, disfunción mitocondrial, procesos que involucran un mal plegamiento de proteínas y su posterior agregación y la excitotoxicidad causada por glutamato (Yacoubian, 2017).

2.2. Enfermedad de Parkinson

La EP fue descrita por primera vez en el año 1817 por el médico inglés James Parkinson como: “movilidad involuntaria temblorosa. Se caracteriza por la disminución de la fuerza muscular, en partes del cuerpo que están en reposo; tendencia a inclinar el tronco hacia adelante y a que el paso se convierta de pronto en carrera; no se afectan los sentidos o la inteligencia”, y se le denominó “Parálisis Agitante” (Parkinson, 2002), nombre que posteriormente sería cambiado por el Dr. Jean-Marie Charcot en el año de 1880.

Actualmente un aproximado de más de 10 millones de personas a nivel mundial presentan EP (National-Parkinson-Foundation, 2017), con una prevalencia de 1% en personas de 65 a 69 años y de hasta 4% en personas mayores de 80 años (Yacoubian, 2017).

La EP presenta una sintomatología motora y no motora, esta última se puede presentar tiempo antes del desarrollo de la sintomatología motora de forma gradual y normalmente el paciente no suele tomarle mucha importancia. Entre estos síntomas no motores se encuentran la fatiga crónica, trastornos de la personalidad como depresión mayor y apatía, trastornos del sueño, problemas para el gusto y la olfacción y monotonía al comunicarse con otras personas. Posteriormente aparecen los síntomas motores ya conocidos como son temblor y rigidez en las extremidades,

lentitud de los movimientos y problemas de equilibrio y coordinación (Lees et al., 2009).

La EP es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta, acumulados de agregados de la proteína α -sinucleína a nivel cerebral y de médula espinal, La principal anormalidad bioquímica presente en estos pacientes es el déficit de dopamina desde las etapas tempranas de la enfermedad (Lees et al., 2009).

Se han propuesto factores ambientales y genéticos como causa de la EP. La mayoría de los casos de la EP se deben a causas ambientales multifactoriales, denominándose EP de tipo esporádica, que alcanza niveles poblacionales tan altos como 90%; el 10% restante de los casos es ocasionado por factores genéticos, denominándose EP familiar (Tomiyama et al., 2008). Hasta el momento, se han identificado 13 *loci* relacionados con la aparición de la EP, de los cuales, los más importantes son los genes que codifican para α -sinucleína, parkin, PINK1, DJ-1 y LRRK2 (Heitz, Morris, & Divita, 2009). Se debe destacar que los factores de riesgo como la exposición a plaguicidas, contaminación ambiental, traumatismos craneoencefálicos y la edad, aunados a la probable carga genética, producen el daño de manera conjunta o por separado (Noyce et al., 2012).

Un factor determinante en la muerte neuronal es la sobre-activación de los receptores para neurotransmisores excitatorios, como el glutamato que provoca la entrada masiva de calcio y su aumento intracelular. Entre los principales mecanismos celulares que se inducen se encuentra el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la alteración del cito-esqueleto neuronal, y finalmente apoptosis como consecuencia de procesos subyacentes (Lees et al., 2009). Para el estudio de estos mecanismos se han desarrollado modelos experimentales a base de fármacos, pesticidas, toxinas y mediante ingeniería genética (Fátima et al., 2015).

2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de mantener la homeostasis. Todas las formas de vida mantienen un balance de óxido-reducción constante. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Lotharius & Brundin, 2002).

Todas las células tienen varios mecanismos antioxidantes de defensa, diseñados para mantener la homeostasis en respuesta a factores de estrés oxidativo.

En el EO leve las defensas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa,

tioredoxinas y peroxirredoxinas (PRXs), aún son suficientes para restablecer dicho balance. Sin embargo, si el estatus oxidativo permanece o se agrava, se producen alteraciones severas en el metabolismo celular (Lotharius & Brundin, 2002). Dentro de estas alteraciones se incluyen rupturas en las cadenas de ADN, aumento en la concentración del calcio intracelular, descompartamentación de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a las membranas y al transporte de iones y proteínas específicas, así como peroxidación de lípidos. El daño por EO, puede revertirse o no dependiendo de diversos factores como el tiempo de exposición al estrés, la funcionalidad de los sistemas antioxidantes, la edad celular, condiciones nutricionales y factores genéticos (Lotharius & Brundin, 2002).

2.4. Peroxirredoxinas

Las PRXs componen hasta el 1% del total de proteínas de una célula, son un grupo de proteínas con función enzimática antioxidante y de señalización redox que controlan los niveles de peróxidos (Wood, Schröder, Harris, & Poole, 2003).

Las PRXs son proteínas muy efectivas en el proceso de limpieza de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. Entre las características que poseen se encuentra una alta susceptibilidad a ser inactivadas por un exceso de sustrato (peróxido), por lo que funcionan como sensores moleculares de reacciones celulares redox. Además, tienen la habilidad de formar estructuras oligoméricas en estados hiperoxidados, y realizan su función por medio de la oxidación de una cisteína del sitio activo a ácido sulfénico por los peróxidos circulantes (Claiborne et al., 1999).

Algunas de las funciones de las PRXs se pueden comparar con aquellas de la GP. Las PRXs se dividen en 3 clases de acuerdo a los residuos de cisteína activos que tengan, (1) una forma típica 2-Cys; (2) una forma atípica 2-Cys y (3) la 1-Cys (Cox, Winterbourn, & Hampton, 2010; Wood et al., 2003). Se han identificado seis tipos de PRXs y se clasifican de acuerdo a su localización subcelular y a la función que realizan en el contexto de disminuir y regular el estrés oxidativo. La PRX1 está altamente relacionada a una tirosina cinasa, lo que la hace partícipe de esta vía de señalización. La PRX2 se encuentra a nivel citosólico donde se encarga de la depuración de especies reactivas de oxígeno además de bloquear señales de muerte celular, la PRX4 realiza su función en retículo endoplásmico en los procesos de ensamblaje proteínico mediados por oxidación. La PRX5 puede ser encontrada en mitocondrias pero su función principal está situada dentro de los peroxisomas. La PRX6 participa en reacciones de oxidación de lípidos además de la función contra daño por oxidación. Otra de las PRXs de vital importancia es la PRX3, debido a su relación con procesos neurotóxicos ocasionados por daño oxidativo y altos niveles de peroxinitritos, y se encuentra solamente en la matriz mitocondrial (Park, Jo, Kim, Lee, & Hong, 2016).

2.5. Peroxirredoxina 3 y su relación con trastornos neurodegenerativos

Las mitocondrias están altamente relacionadas a la muerte celular por excitotoxicidad, como la que ocurre en la EP y la EA, debido a una alta carga de calcio, producto de distintos estímulos como neuroinflamación o vías de señalización celular, lo que produce un aumento de ROS. La generación de ROS no solo daña irreversiblemente a las mitocondrias y su sistema transportador de electrones, sino también ocasiona una mayor generación de ROS que abre poros en la membrana celular y ocasiona activación de cascadas pro-apoptóticas ocasionando la muerte celular (Cox et al., 2010; Hattori, Murayama, Noshita, & Oikawa, 2003).

Una de las proteínas encargadas de mantener el equilibrio de ROS a nivel mitocondrial es la Peroxirredoxina 3 (PRX3). El gen de la PRX3 se localiza en el cromosoma 10 en el genoma humano, codifica una secuencia de 256 aminoácidos, además de una secuencia de dirección mitocondrial que posteriormente es escindida. Pertenece a la clase 2-Cys de las PRX, pues cuenta con dos cisteínas, las cuales funcionan como unidades catalizadoras. Estructuralmente es una proteína globular que al oxidarse forma homodímeros hasta llegar a una forma estable en forma de “dona” compuesta por 12 monómeros. Se cree que esta forma tiene funciones de chaperona y regula procesos de señalización celular ligados a REDOX (Cox et al., 2010; Wood et al., 2003). Se expresa en todo el sistema nervioso central, a excepción de una baja expresión en el hipocampo y en la sustancia nigra pars compacta. Se cree que la baja expresión de PRX3 en estas regiones, puede contribuir a la vulnerabilidad celular a los ataques nitro-oxidativos que ocurren en la EP y EA (Goemaere & Knoop, 2012).

Se han planteado algunas hipótesis acerca de cómo un aumento o disminución de esta proteína podría afectar la forma en la que ENGs se desarrollan y evolucionan, pues como hemos mencionado anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los mecanismos de daño celular principales en la etiopatogenia de estas enfermedades.

Por ejemplo, en un modelo de daño celular oxidativo inducido por el ácido iboténico, que produce gliosis y nitración de proteínas como el observado en la EP y EA, se demostró que la PRX3 disminuye estos procesos de forma importante mediante el uso de adenovirus (Hattori et al., 2003).

La importancia de PRX3 en los procesos de inflamación que generan estrés oxidativo quedó demostrada al observar un marcado aumento en las especies reactivas de oxígeno en macrófagos posterior a la inoculación con lipopolisacárido (LPS) en ratones que carecen el gen PRX3 (Li et al., 2007).

Otro de los factores que contribuye al aumento de ROS es la exposición a sustancias (por ejemplo pesticidas) que tienen propiedades neurotóxicas, y que han sido utilizadas ampliamente como modelos de estudio de enfermedades neurodegenerativas, como la EP. En este caso, la utilidad a nivel celular de proteínas con capacidades regulatorias del equilibrio REDOX es fundamental. En el estudio de De Simoni y cols., demostraron como en células de fenotipo dopaminérgico (SH-SY5Y) a las que se les ha bloqueado la expresión de PRX3 por medio de RNA en horquilla y en presencia de 1-metil-4 fenilpirideno (MPP⁺) (un ya conocido compuesto con propiedades neurotóxicas utilizado como modelo de enfermedades neurodegenerativas por su capacidad para inhibir el complejo I mitocondrial), se incrementó la susceptibilidad al estrés oxidativo (De Simoni, Goemaere, & Knoops, 2008), pues como mencionó anteriormente, las células de la sustancia nigra productoras de dopamina consumen mucho oxígeno, cuentan con pocas defensas antioxidantes y contienen altos niveles de hierro.

En los casos estudiados de EP familiar se han identificado varios genes como los causantes de esta enfermedad. Entre ellos, se encuentra el gen PARK8 que ha sido relacionado con la muerte neuronal causada por un aumento en ROS a nivel de la sustancia nigra (Angeles et al., 2011; Paisán-Ruiz et al., 2004). Se ha demostrado una asociación directa entre la mutación de este gen en la EP con la PRX3, explicando así su relación con el estrés oxidativo. El gen PARK8 codifica para una cinasa rica en leucina (LRRK2) que al estar mutada incrementa su actividad de fosforilasa, y una de sus proteínas blanco es la PRX3, que al ser fosforilada se inactiva, y por lo tanto se incrementa el estrés oxidativo ocasionando la muerte de las neuronas. En este estudio analizaron muestras post mortem de cerebros de pacientes con EP donde hubo un aumento en la fosforilación de la proteína PRX3, demostrando así el aumento en la función de la cinasa, además del marcado aumento de ROS a nivel celular. Además, mediante inmunoprecipitación, demostraron que existe una interacción física entre LRRK2 y la PRX3, lo que confirma la íntima relación entre ambas (Angeles et al., 2011).

Debido a la asociación del estrés oxidativo elevado con la muerte neuronal, y la baja expresión de la PRX3 a nivel celular en el sistema nervioso, una estrategia terapéutica prometedora consiste en la utilización de genes que codifiquen enzimas antioxidantes como la PRX3. En este tipo de terapia se pueden utilizar distintas clases de vectores que puedan atravesar la barrera hematoencefálica, además de tener un alto tropismo por células nerviosas para así poder entregar los genes terapéuticos. Se han desarrollado distintos sistemas de entrega que se analizarán más adelante.

2.6. Entrega Terapéutica

Existen distintos tipos de moléculas que han sido utilizadas como vehículo para la entrega de diversas sustancias con fines terapéuticos. Los hay sintéticos como el

poliplex, las nanopartículas y polímeros catiónicos, estos, aunque recientemente están siendo más utilizados, no cuentan con la capacidad de dirigirse a células específicas. Existen también los vectores virales como los adenovirus, los cuales son los más ampliamente utilizados, tienen la más alta tasa de transducción, pero suelen ser altamente inmunogénicos y pueden tener capacidad oncogénica como los lentivirus y retrovirus. Por último, tenemos los péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs). Estos son pequeñas secuencias de alrededor de 30 aminoácidos que tienen la habilidad de transportar diferentes clases de moléculas que normalmente no pueden ingresar en la célula (Zhang, Wang, & Xu, 2016).

2.7. Péptidos con Capacidad de Penetración Celular (CPPs)

A finales de los 80's y principios de los años 90 se identificaron pequeñas secuencias de péptidos que tienen la habilidad de transportar diferentes clases de moléculas que normalmente no tienen la capacidad de ser internalizadas a la célula, como ácidos nucleicos y proteínas (Heitz et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, los CPPs son péptidos cortos de alrededor de 30 aminoácidos, con capacidad de penetración celular que pueden encontrarse de manera natural o ser sintetizados, y se optimizan como vectores para el transporte de macromoléculas (Zhang et al., 2016).

Para mejorar la eficiencia de los sistemas basados en CPPs se han realizado cambios de aminoácidos en las cadenas peptídicas originales para aumentar sus niveles de cargas positivas, lo que les permite una mayor capacidad de penetración celular. Dos de las sustituciones más utilizadas son el incremento de argininas e histidinas (aminoácidos con carga positiva). Se ha demostrado en varios polipéptidos ricos en arginina, que esta característica les brinda propiedades para atravesar la membrana (Åmand, Fant, Nordén, & Esbjörner, 2008; S Futaki et al., 2001; Shiroh Futaki, 2005).

Uno de los primeros CPPs que llamó la atención fue TAT, derivado de la proteína transactivadora de la transcripción (TAT) del Virus de Inmunodeficiencia Humana, el cual entra eficientemente en las células y promueve la expresión génica viral (Green & Loewenstein, 1988). Se ha reportado que el péptido TAT 47-57 (YGRKKRRQRRR) puede transportar macromoléculas de manera exógena hacia el cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y depresión en modelos experimentales (Wu et al., 2006).

Otro de los CPPs con propiedades neurotróficas es la glucoproteína del virus de la rabia (RVG), que es una molécula de 29 aminoácidos con capacidad de unión al receptor de acetilcolina (Fu, Wang, Zhan, & Zhou, 2012). También se ha demostrado que el RVG29 puede entregar DNA hacia el cerebro e internalizarse dentro de las neuronas como un componente no-viral (Fu, Zhang, Gao, Xu, & Chen, 2013; Villa-Cedillo SA, 2017).

2.8. Glucoproteína del Virus de la Rabia (RVG)

La glucoproteína del virus de la rabia (RVG) es una glucoproteína de membrana compuesta por 505 aminoácidos, es el único componente viral expuesto en la superficie del virus y es el mayor determinante de su patogenicidad (Zhu & Guo, 2016). El péptido RVG se une al receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) a nivel de las uniones neuromusculares y la barrera hematoencefálica (Lentz, Burrage, Smith, Crick, & Tignor, 1982; Phoolcharoen et al., 2017). La unión del virus de la rabia a AChRs en las uniones neuromusculares permite su transportación e internalización al SNC. Sin embargo, otras moléculas deben estar involucradas en la infección por el virus de la rabia dado que al bloquear los AChRs no se previene del todo la infección (Fu et al., 2013).

La RVG posee propiedades neurotróficas y es por ello que algunos fragmentos de esta proteína se han utilizado para el transporte de moléculas cargo al cerebro. El primer trabajo que describe la utilización de esta molécula fue presentado por Kumar y cols. Hace apenas 10 años utilizaron un péptido corto de 29 aminoácidos de la proteína RVG (RVG29) para dirigir siRNA al SNC mediante una aplicación intravenosa, logrando inhibir la expresión del virus de la encefalitis japonesa. Además, este grupo demostró que el péptido RVG29 interactúa específicamente con células de tipo neuronal (Kumar et al., 2007). Se han probado conjugados con el péptido RVG obteniendo resultados prometedores para utilizarlos como vectores para terapia génica en el cerebro. Varios estudios los han utilizado para transfectar neuronas con ácidos nucleicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Rohn, S., 2012; Son et al., 2011).

Estudios recientes han probado complejos modificados de RVG ligado a moléculas de quitosán trimetilado para la entrega de siRNA al cerebro, demostrando una mayor afinidad por los tipos celulares que tienen receptores de acetilcolina así como la entrega efectiva de siRNA al cerebro. Además, se demostró un efecto silenciador efectivo para el gen BACE1, como un blanco terapéutico para la EA (Gao et al., 2014).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el reemplazo de aminoácidos en los CPPs puede incrementar la internalización de la molécula cargo en las células blanco. Faber y colaboradores descubrieron que un solo cambio de un aminoácido en el sitio de unión al AChR en la RVG incrementa la propagación y patogenicidad del virus de la rabia. Observaron que los cerebros de ratones infectados con el virus de la rabia portando una mutación de asparagina por lisina presentaban una mayor cantidad de células infectadas en las regiones de hipocampo e hipotálamo (Faber et al., 2005).

De acuerdo con estos resultados observados por el grupo de Faber y colaboradores, nuestro grupo de investigación introdujo la mutación de asparagina por lisina en el péptido RVG29 (RVG29m), logrando aumentar la eficiencia de transfección de un gen reportero en una línea celular de fenotipo neuronal y en cultivos primarios de

astrocitos (Villa-Cedillo et al., 2017). En este trabajo se transfectó la línea celular de fenotipo dopaminérgico SHSY-5Y, con los complejos RVG29 silvestre y mutante, donde se pudo observar una mayor transfección con el complejo RVG29m.

2.9. Modelo de la enfermedad de Parkinson utilizando plaguicidas

Para probar posibles terapias utilizando péptidos, se utilizan distintos modelos de la EP, tanto a nivel celular como animal, empleando distintos mecanismos para su inducción como manipulación genética, vías farmacológicas y moléculas con propiedades neurotóxicas.

Dentro de las moléculas con propiedades neurotóxicas que han sido ampliamente estudiadas encontramos a los plaguicidas, que se han relacionado con la EP en diversos estudios epidemiológicos. Por esta razón, se ha mostrado interés en su uso para desarrollar modelos animales de parkinsonismo. Uno de los plaguicidas más utilizados es el paraquat (PQ), el cual tiene la característica de ser selectivamente tóxico para las neuronas con fenotipo dopaminérgico como las encontradas en la sustancia nigra del cerebro, manifestando así un cuadro clínico similar al que se presenta en la EP. El PQ cruza la barrera encefálica de manera lenta, por lo que su administración debe darse en periodos de semanas. Se evidencia por medio de la disminución de la densidad de las terminaciones nerviosas además de disminución en la coordinación motora como se observa en la EP (Marianne et al., 2012).

Ha sido demostrado que el PQ produce cambios subcelulares ligados a los encontrados en la EP, como el aumento de ROS, agregaciones de alfa-sinucleína (cuerpos de Lewy) y lesiones selectivas de la SN, (Rappold et al., 2011).

3. Justificación

Hoy en día, se reconoce el gran problema de salud que representan las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP, para la cual actualmente no existe una terapia efectiva que combata el proceso de neurodegeneración. Además, tanto factores genéticos como ambientales ocasionan una disfunción a nivel mitocondrial y una disminución de la proteína PRX3 en la sustancia nigra, ocasionando una alta susceptibilidad al estrés oxidativo. Por lo tanto, es importante evaluar una terapia génica antioxidante utilizando el gen de la PRX3 en un modelo de la EP.

4. Hipótesis

El gen de la Prx3 es eficaz como terapia antioxidante en un modelo de la Enfermedad de Parkinson.

5. Objetivo General

Evaluar el gen de la Prx3 como terapia antioxidante en un modelo de la Enfermedad de Parkinson.

6. Objetivos específicos

1. Determinar la relación óptima de los componentes del complejo RVGm-PRX3.
2. Evaluar la eficiencia de transfección del complejo RVGm-PRX3 en células de fenotipo neuronal.
3. Evaluar el efecto de la PRX3 en la función motora y cognitiva de un modelo animal de la EP.
4. Analizar el efecto de la PRX3 sobre la población de neuronas dopaminérgicas de la SN en un modelo animal de la EP.

7. Materiales y equipo

7.1. Material Biológico

7.1.1 Péptidos

- RV29m (YTIWMPENPRPGTPCDIFTKSRGKRAS-NGGGRRRRRRRRR)
- Vector: pRP[Exp]-EGFP-CMV>mPrdx3[ORF030771] (Anexo 1)

El péptido fue obtenido de United Peptide Corporation (Herndon, VA, USA). El vector ha sido obtenido de la compañía VECTORBUILDER®.

7.1.2 Animales

36 ratones machos de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas y fueron mantenidos en ciclos de 12 horas luz/obscuridad bajo libre acceso a comida y agua. Fueron adquiridos de Círculo de ADN SA de CV (Cd. De México). El manejo de los murinos fue acorde a lo descrito por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO -1999. Para el manejo de los animales se utilizó el anestésico ketamina/xilacina.

7.1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos anti tirosina hidroxilasa (TH) y anti-PRX3 fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA, USA). Los anticuerpos goat anti-mouse FITC y goat anti-rabbit rodamina fueron obtenidos de Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). DAPI mounting solution fue obtenido de Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA).

7.1.4 Línea celular

Células de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC).

7.2. Soluciones

- Agarosa (Sigma-Aldrich) al 1% en TAE 1X.
- Buffer TAE 1X: 40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA.
- Paraformaldehído 4% (PFA) (Sigma-Aldrich) Preparar en PBS1X.
- Paraquat (10 mg/kg).
- PBS 1X: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄ pH 7.2-7.4.
- PBS-Tritón 0.1X: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄; 0.9 mM Tritón X-100. pH 7.2-7.4.

- Buffer de citratos: 10 mM ácido cítrico; 0.05% Tween 20, pH 6.0.
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).
- DMEM /Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12).
- alta-glucosa DMEM.
- Suero Fetal Bovino (SFB).
- 100X solución antibiotica/antimicótica.
- 0.25% Tripsina-EDTA.
- TurboFect® *in vitro* transfection.

7.3. Equipo de laboratorio

- Balanza analítica (GR-120, AND).
- Equipo esterotáxico con barras para los oídos de 18° y un adaptador para ratón (Stoelting).
- Material de cirugía y disección (tijeras, pinzas, escalpelo no. 3, navajas no. 15, microtaladro marca Stoelting, pinza gubia para hueso (Stoelting) y equipo para rasurar.
- Bomba de infusión (Stoelting).
- Jeringa de 10 µL (Hamilton serie 900).
- Bomba peristáltica (FH100, Thermo Fisher scientific).
- Micropipetas 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl y 10 µl (Labnet).
- Cámara de electroforesis de geles de agarosa (B1A, Owl Separation Systems, Inc.).

- Transiluminador UV (2000, Bio-Rad).
- Espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf).
- Campana de Flujo Laminar Clase II (AH-100, TelStar).
- Termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc).
- Fuente de poder (300 Plus, Labnet).
- Vortex (VX-100, Labnet).
- Histoquinete (Kedee).
- Centro de inclusión KD-BM (Kedee).
- Crioplaca KD-BL (Kedee).
- Micrótopo para bloques de parafina (RM2245, Leica).
- Baño de flotación KD-P (Kedee).
- Microscopio de campo claro (DM500, Leica) con cámara Nikon Eclipse 50i (5.0 RTV, Micropublisher).
- Software para conteo manual de células (Cell counter-ImageJ).
- Software para gráficas y análisis estadísticos (Grap Pad Prism 6).

7.4. Consumibles

- Tubos de 50 ml y 15 ml (Corning).
- Tubos Eppendorf de 1.5 μ L.

- Jeringas de Insulina 0.5 ml y 0.3 ml (BD Ultrafine).

7.5. Equipo para pruebas

- Laberinto de madera.
- Adhesivos Avery® Multicolor de 1/4".
- Poste de madera de 50 cm.
- Cilindro de cristal.

8. Estrategia General

Primero utilizamos la estrategia ya establecida en el laboratorio para el envío de genes generando complejos formados por el plásmido portador del gen de interés y por el péptido RVG29m. Una vez que se obtuvieron estos complejos se confirmó la expresión del gen PRX3 en células de fenotipo neuronal por medio de transfección con los complejos, además de un reactivo comercial. Posteriormente, se administraron mediante estereotaxia a ratones a los que se les indujo la EP y evaluamos su efecto sobre la función motora y cognitiva. Finalmente, analizamos su efecto en la población de células dopaminérgicas de la sustancia nigra.



Figura 1. Estrategia general.

9. Metodología científica

Para cumplir con el primer objetivo se prepararon los complejos RVG29m-PRX3 y se caracterizaron por geles de retardo.

Se evaluaron 7 proporciones distintas de los componentes del complejo: el péptido RVG29m y el plásmido pRP-EGFP-PRX3 [ORF030771] que codifica para la proteína PRX3 y la proteína verde fluorescente (GFP). Los complejos RVG29m-PRX3 se prepararon usando 2 µg de plásmido e incubados a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos mediante agitación constante con el péptido mRVG29 a las concentraciones plásmido:RVG de 2:0.5, 2:1, 2:2, 2:4, 2:8 y 2:16 µg. Después de la incubación, los complejos fueron mezclados con buffer de carga y analizados en geles de retardo. Se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 g/mL en el gel). Los geles fueron fotografiados en el equipo DIGI DOC-IT.

Para cumplir con el segundo objetivo, se utilizaron las células de fenotipo neuronal SHSY-5Y para evaluar la eficiencia de transfección del complejo RVGm-PRX3 mediante la detección de la expresión del gen PRX3. Las células fueron cultivadas en DMEM/F-12, y posteriormente transfectadas con el complejo RVGm-PRX3, así como con Turbofect™.

Para cumplir con los objetivos tres y cuatro, se administró el complejo RVG-PRX3 (100 ng) en la región del cuerpo estriado por medio de cirugía estereotáxica. Tres días después se inició el tratamiento con Paraquat (PQ) para inducir el modelo de

la EP. El PQ se administró a una dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 6 semanas. Se utilizaron 6 ratones por grupo como se encuentra descrito en la literatura acerca del modelo *in vivo* de EP con PQ, donde se utilizan de 6 a 7 animales por grupo. Se concretaron 6 grupos experimentales como sigue:

- 1.- SHAM (control de cirugía esterotáxica)
- 2.- PBS intraperitoneal (como control negativo de PQ)
- 3.- PRX3
- 4.- PBS+PQ
- 5.- PRX3+PQ
- 6.- PQ

Los ratones se monitorearon cuidadosamente antes de la anestesia y durante la cirugía, se observó el patrón respiratorio del animal, los ojos y los reflejos podal y anal.

Después de la última inyección con PQ se llevó a cabo la evaluación de la disfunción motora y cognitiva.

Finalmente, se sacrificaron los ratones dos días después de la última inyección intraperitoneal con PQ, se anestesió al ratón con una mezcla de ketamina/xilacina y se fijaron los tejidos por medio de perfusión cardíaca con PFA al 4%. Se extrajo el cerebro, y se obtuvieron cortes histológicos para su análisis con marcadores específicos para células dopaminérgicas (Tirosina Hidroxilasa).

Se utilizaron ratones machos de 8/10 semanas de edad de la cepa C57BL6/J. Los cuales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada, ciclos de luz/obscuridad de 12 h con libre acceso a alimento y agua.

A continuación, se describen los diferentes procedimientos que se utilizaron durante el desarrollo del protocolo.

9.1. Cultivo y transfección celular

Las células SH-SY5Y se cultivaron en DMEM/F-12. El medio fue suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico/antimicótico. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para la transfección, las células fueron sembradas en cajas de 24 pozos a una densidad de 8×10^4 células/pozo. Los complejos RVG29-PRX3 se prepararon en

200 μ l de DMEM con 2 μ g de DNA a TA en agitación constante por 30 min. Los complejos RVG29-PRX3 se añadieron a las células SH-SY5Y al alcanzar un 60% de confluencia y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Como controles positivos de la expresión de GFP y PRX3, se realizaron transfecciones con el plásmido usando Turbofect de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

9.2. Tratamiento de cubreobjetos con APTES

Los cubreobjetos se sumergieron en una solución de H₂SO₄ al 20% durante 1 h. Se enjuagaron 4 veces en agua MilliQ®. Se sumergieron en una solución de NaOH 1 N durante 5 min. Se enjuagaron 4 veces en agua MilliQ®. Se dejaron secar por 30 min. Se colocaron en una caja Petri de vidrio y se adicionó 1 mL de APTES durante 4 min. Se enjuagaron los cubreobjetos hasta dejar libre de residuos en agua MilliQ®. Se dejaron secar y se esterilizaron a 20 lb por 15 min.

9.3. Inmunofluorescencia *in vitro*

Se utilizó la inmunofluorescencia indirecta para analizar la eficiencia de la transfección. Las células fueron lavadas en PBS 1X pH 7.4 frío, y posteriormente fijadas en PFA al 4% por 15 min a RT. Después se lavaron con PBS 1X conteniendo tritón x-100 al 0.1%, las células fijadas fueron bloqueadas en suero de caballo al 10% por 1 h. Las células ya bloqueadas se incubaron toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (suero de caballo al 1% en PBS-Tritón). Los anticuerpos usados fueron: anti-PRX3 (1:500), anti-GFP (1:1000). Después, las células fueron lavadas en PBS-Tritón 3 veces por 5 min e incubadas con anticuerpos secundarios diluidos en PBS-Tritón por 2 h a RT. Los anticuerpos secundarios usados fueron goat anti-mouse FITC (1:200) and goat anti-rabbit rhodamine (1:200). Los controles negativos fueron preparados omitiendo el anticuerpo primario. Para teñir los núcleos las células se lavaron con PBS y fueron montadas con DAPI mounting solution. Las inmunofluorescencias se observaron usando un microscopio de fluorescencia Leica.

9.4. Cirugía Estereotáxica

La administración de los complejos RVG26m-PRX3 *in vivo*, se realizó en ratones de la cepa C56BL/J de 10 semanas y 25 \pm 2 gr de peso. Se anestesiaron con ketamina/xilacina (80-100 mg/Kg de ketamina y 10-10.5 mg/Kg de xilacina). Se colocaron en el aparato estereotáxico con la barra de incisivos a 6 mm por debajo de la línea interaural. Se ajustaron las coordenadas para cuerpo estriado: AP +0.38 mm desde la línea interaural, ML -2 mm y DV -3.12 mm desde la corteza cerebral. Después de la trepanación craneal se micro-inyectaron 5 μ L de los complejos RVG29m a una velocidad de 0.1 μ L/min.

9.5. Modelo animal de la EP

Para inducir el modelo animal de la EP se utilizó el herbicida paraquat, el cual ha sido previamente establecido por nuestro grupo de trabajo. Cuatro días posteriores a la cirugía estereotáxica, el paraquat se administró en 3 de los 7 grupos experimentales a una dosis de 10 mg/kg, dos veces por semana, durante 7 semanas. El peso corporal de los ratones se monitoreo semanalmente. El PQ se mantuvo almacenado de forma segura. Para el manejo del PQ, el personal utilizó bata de manga larga, pantalones (de algodón) y calzado no absorbente. Además, fue indispensable el uso de guantes y protección ocular. En todo momento se manejó en campana de flujo laminar.

9.6. Evaluación de la función motora y cognitiva

Después de 7 semanas de tratamiento, se evaluó la función motora gruesa de los ratones mediante una prueba en donde se hizo un análisis de la marcha, en el cual se evaluó la base de apoyo de las patas y el andar de cada animal. Los animales recibieron un entrenamiento previo para que se habituaran a la prueba de pista. La pista estaba iluminada en el inicio, y al final se encontraba una cámara oscura con recompensa alimenticia. Una vez entrenados los ratones, se procedió a evaluar su marcha. Se sumergieron las patas delanteras y trasera en pintura no-tóxica, las patas delanteras se pintaron de color rojo y las patas traseras se pintaron de color negro o azul. De esta manera, quedaron impresas las huellas de las patas sobre un papel blanco que se encontraba en el piso de la pista.

Para evaluar la función motora fina y evaluar el comienzo de la marcha se utilizaron dos pruebas, la prueba de la remoción del adhesivo y la prueba del poste, respectivamente.

La prueba de remoción del adhesivo consistió en la aplicación de un adhesivo circular de colores de ¼” en el espacio entre el hocico y la nariz del roedor, posteriormente se cronometró el tiempo que le tomó a éste retirarlo, y se analizó estadísticamente (Sheila M. Fleming, Ekhaton, & Ghisays, 2013).

La prueba del poste es utilizada para evaluar el daño a células dopaminérgicas en modelos murinos de la EP (Matsuura, Kabuto, Makino, & Ogawa, 1997).

Consiste en un poste de madera de 50 cm con una base colocada en la caja del ratón. Se coloca al ratón cabeza arriba en la punta del poste, y posteriormente se mide con cronómetro el tiempo que tarda en orientarse boca abajo, y el tiempo que le toma descender a la caja. Se realizan tres eventos por ratón.

La prueba cognitivo-motora se evalúa observando la actividad espontánea del ratón. La prueba que utilizamos en nuestro experimento fue la prueba del cilindro, en ésta se coloca al ratón dentro de un cilindro de cristal y se cuentan las veces que el ratón

se para en sus patas traseras y toca el cristal con sus patas delanteras (Sheila M. Fleming et al., 2013).

9.7. Obtención de los tejidos

La fijación de los cerebros de los ratones fue con paraformaldehído mediante la técnica de perfusión cardíaca. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina a una concentración de Ketamina de 80-100 mg/Kg y de Xilacina de 10-10.5 mg/Kg, respectivamente. Posteriormente, se realizó una incisión a lo largo de toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural. Después se realizó una incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo y se pasó una aguja a través de la pared de la aorta. Por último, se hizo una incisión en la aurícula derecha con unas tijeras y se conectó la bomba peristáltica para perfundir al animal con 25 ml de PBS 1X frío y después con 25 ml de PFA al 4% (en buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4). Después de la perfusión se disecó el cerebro de los animales, y se realizó una post-fijación en PFA al 4% por 12 h. Posteriormente, se incubaron en alcoholes a concentraciones descendentes para el proceso de deshidratación durante toda la noche. Después, los cerebros se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 μ m en un microtomo semiautomático.

9.8. Inmunofluorescencia

Se rehidrataron los cortes histológicos mediante xilol (dos veces), alcoholes al 100%, 95%, 75%, y agua MilliQ. Se procedió a hacer la recuperación de epítopes con Buffer de Citratos pH 6.9. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1x. Se realizó la permeabilización de las células realizando 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Se bloquearon los sitios inespecíficos durante 1 h con Suero de caballo 10% preparado en PBS-Tritón 0.1%. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche, y posteriormente con el anticuerpo secundario diluidos en PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.5% o PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.0% durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados más de 5 min cada uno con PBS 1x. Se secaron los cortes en los portaobjetos y se montaron con VECTASHIELD®.

9.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se determinó la significancia entre dos grupos con t-student a dos factores y el análisis entre tres o más grupos se realizó con una prueba de ANOVA de un factor seguido de una corrección de Tukey, también se utilizó la prueba paramétrica Kruskal-Wallis mediante el software Graphpad Prism 6.0. Los datos se presentaron como media \pm SD. Una $P < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

10. Resultados

10.1. Relación óptima para la formación del complejo RVG29m-PRX3.

Para determinar la relación óptima necesaria para la unión de los componentes del complejo se realizó una mezcla del plásmido que expresa PRX3 con el péptido RVG29m.

Ambos componentes se unen entre sí por medio de cargas electrostáticas para formar el complejo RVGm-PRX3. Las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA interactúan con las cargas positivas de la cadena de argininas de la secuencia del péptido RVG29m.

Por lo tanto, se realizaron mezclas donde el plásmido se mantuvo a una concentración constante de 2 μg y se probaron diferentes concentraciones del péptido de penetración celular RVG29m de 0, 0.5, 1, 2, 4, y 8 μg .

En la **Figura 2** podemos observar en el primer carril, la banda la migración del plásmido PRX3 (2 μg). En el segundo carril no se observa un retardo en la migración del complejo formado por el plásmido (2 μg) y 0.5 μg del péptido RVG29m. En el

RVGm (μg)

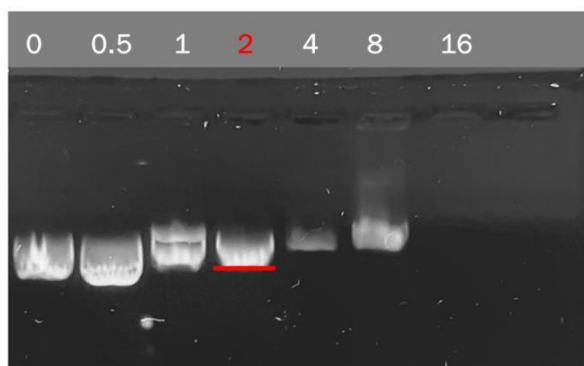


Figura 2. Gel de retardo del complejo RVG29m-PRX3.

Para determinar la relación molar óptima se utilizó la misma concentración del plásmido PRX3 (2 μg) y diferentes concentraciones del péptido RVG29m (0-16 μg). La relación óptima del complejo fue de 2 μg de RVG29m y 2 μg de plásmido, la cual mostró un retardo en la migración del complejo (carril 4, señalado en color rojo) con respecto al plásmido con el gen PRX3 sin péptido (carril 1).

tercer y cuarto carril se observa un retraso en la migración, sin embargo, es más evidente en este último en donde se usó una proporción 2:2. Después observamos que la proporción 2:4 el complejo no logra atravesar los poros de agarosa, pues se forma una molécula bastante grande. En la relación 2:2 donde están presentes ambos componentes del complejo se observó además un retardo en la migración de este, por lo que fue la relación seleccionada para evaluar la eficacia de transfección del este complejo en células de fenotipo neuronal, para posteriormente utilizarlo en un modelo de la EP, mediante su administración estereotáxica. La relación óptima de los complejos es aquella donde se observa mayor retención en el pozo del gel de agarosa buena concentración.

10.2. Expresión de GFP y PRX3 en células de fenotipo neuronal.

Para evaluar si el plásmido PRX3-GFP era capaz de expresar estas proteínas, se transfectaron células de la cepa SH-SY5Y con fenotipo dopaminérgicas, usando Turbofect de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se pueden observar en la figura 3 los núcleos de las células (azul), los cuales coinciden con la expresión de la GFP (verde), así como con las células positivas para Peroxirredoxina 3 (Prx3), de esta manera podemos concluir que el plásmido PRX3-GFP puede ser expresado de manera ectópica en la línea celular dopaminérgica.

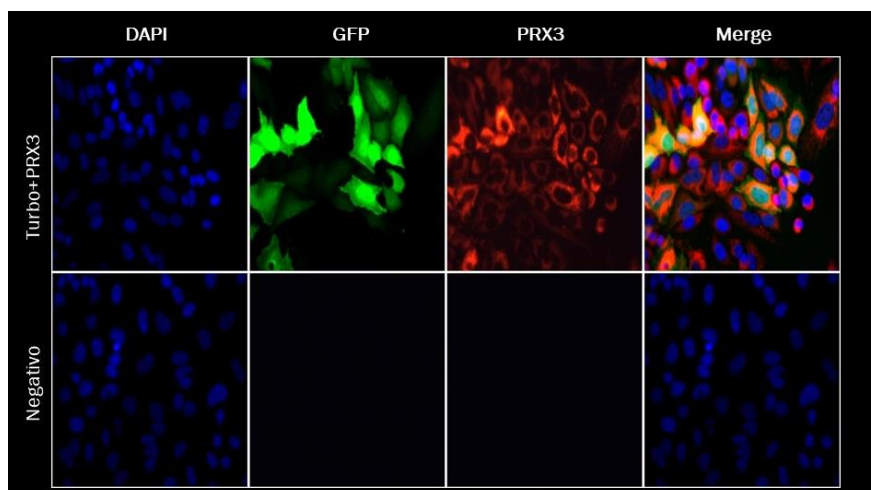


Figura 3. TurboFect-PRX3 es capaz de transfectar células de fenotipo neuronal. Las células SH-SY5Y fueron transfectadas con el plásmido PRX3-GFP utilizando Turbofect y el control negativo no fue transfectado. Se utilizó solo anticuerpo anti-PRX3 y se detectó la señal de la proteína verde fluorescente sin añadir anticuerpo en comparación con el control negativo.

10.3. El péptido de penetración celular RVGm es capaz de internalizar el plásmido PRX3-GFP en células dopaminérgicas.

Posteriormente, para determinar si la proporción del péptido de penetración celular RVGm y el plásmido PRX3-GFP era la correcta para inducir la expresión de Prx3 como proteína de interés, y la GFP como proteína reportera, se utilizó la proporción de 2 µg de RVGm y 2 µg PRX3-GFP (2:2), en las células SH-SY5Y. Como podemos observar, en el primer cuadro se utilizó DAPI para marcar los núcleos con fluorescencia (azul), en color verde podemos ver la expresión de la GFP y en color rojo la Prx3. Por lo tanto, se pudo determinar que el péptido de penetración celular RVGm en presencia del plásmido PRX3-GFP es capaz de transfectar las células dopaminérgicas en cultivo celular.

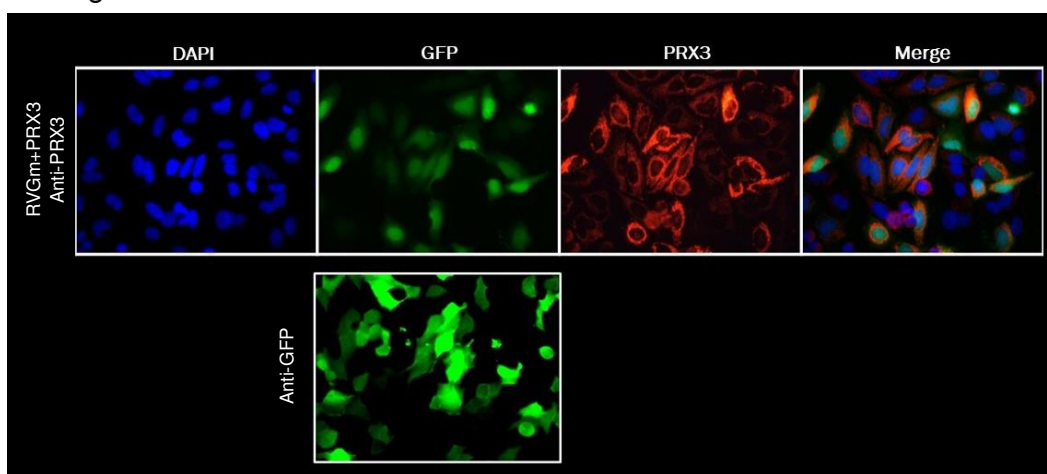


Figura 4. El complejo RVGm-PRX3 es capaz de transfectar células de fenotipo neuronal. Las células SH-SY5Y fueron transfectadas con el complejo RVGm-PRX3, el control negativo no fue transfectado. Se utilizó anticuerpo anti-PRX3 y se detectó la señal de la GFP sin añadir anticuerpo en comparación con el control negativo. Se añadió en otro experimento anticuerpo anti-GFP donde se observa una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con las que no tenían anticuerpo.

10.4. El complejo RVGm-PRX3 disminuye el deterioro en la función motora y cognitiva ocasionado por el paraquat.

Una vez comprobada la capacidad de transfección de nuestro complejo, se establecieron las coordenadas para su administración en el cuerpo estriado de ratones, se realizó la estereotaxia administrando el complejo RVGm-PRX3 a los ratones de los distintos grupos formados por 6 ratones cada uno (Figura 5). Para establecer el modelo de la EP, el cuarto día postcirugía, se les administró PQ (10 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) a lo largo de 6

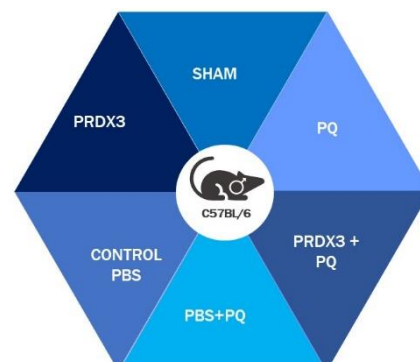


Figura 5. Grupos experimentales

semanas con una frecuencia de dos veces por semana, mientras que al grupo control se le administró PBS (**Figura 6**).

Al término de la sexta semana se realizaron pruebas para evaluar cambios en la función cognitiva y motora. Una de las características de la EP es la pérdida de la coordinación motora, una incapacidad para realizar la marcha y un retardo en la misma, debido a la pérdida de neuronas de fenotipo dopaminérgico en la vía nigroestriatal (Fátima et al., 2015) Esta vía está encargada del control del músculo esquelético, por lo que evaluamos si la función motora de los ratones de cada uno de los grupos presentaba alguna alteración en cada uno de sus aspectos: la motricidad gruesa, la motricidad fina y el inicio de la marcha. Además de la sintomatología motora encontramos síntomas no motores que se presentan en la EP debido al daño causado en la vía mesolímbica y mesocortical es la disfunción cognitiva, la cual también fue evaluada.

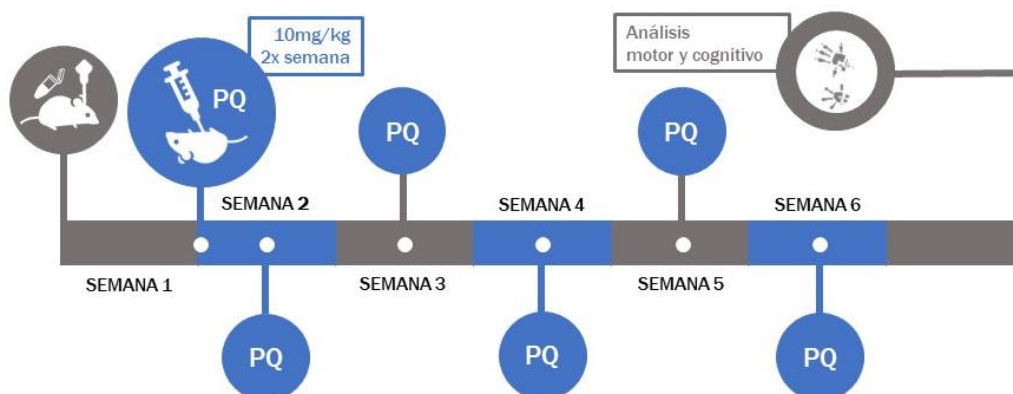


Figura 6. Modelo de EP utilizando PQ. Se estableció el modelo de EP utilizando PQ intraperitoneal 2 veces por semana durante 6 semanas, previo a esto se administró el complejo RVGm-PRX3 mediante cirugía estereotáctica.

El principal problema en la EP es la disfunción motora, desde la motilidad fina necesaria para realizar acciones precisas hasta la motilidad gruesa necesaria para iniciar y continuar la marcha (Lees et al., 2009). Se realizó un análisis de la marcha, que es una herramienta sensitiva para examinar la locomoción y la coordinación de las extremidades en roedores pequeños (S. M. Fleming, 2004). El análisis consiste en que el ratón, con las patas delanteras y traseras impregnadas con tinta de color rojo y azul, respectivamente, atraviese un túnel recto donde se imprimen o capturan las huellas al caminar, y se evalúa la base de soporte y el caminar de cada ratón.

Para determinar su función motora, se midió la distancia que recorren las patas de cada ratón, la longitud de balanceo, de paso y postura, como se muestra en la **Figura 7**.

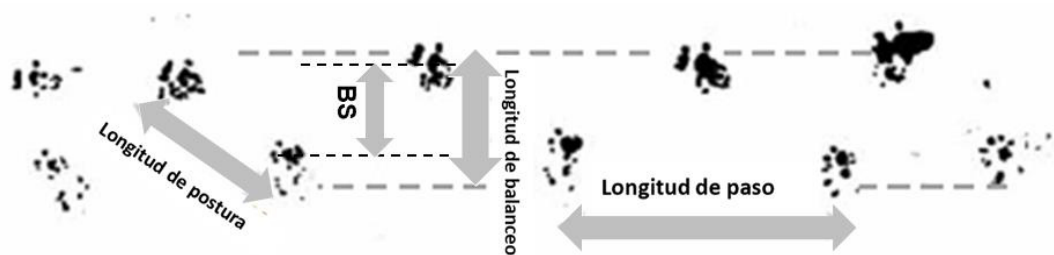


Figura 7. Representación gráfica de los parámetros seleccionados para el análisis de la marcha. (BS, base de soporte).

En general, no se observó diferencia significativa entre el balanceo (**Figura 8A**), la longitud de postura (**Figura 8B**), que es comparable a la forma en la que un humano balancea los brazos al caminar, y la longitud de paso (**Figura 8C**) de los diferentes grupos. . Por otro lado, se observó diferencia significativa en la longitud de apertura entre las patas del grupo tratado con PRX3, lo que nos indica la mejoría de los ratones al inicio y durante la marcha (**Figura 8E**) el resto de los resultados pueden ser observados en la **Figura 8**.

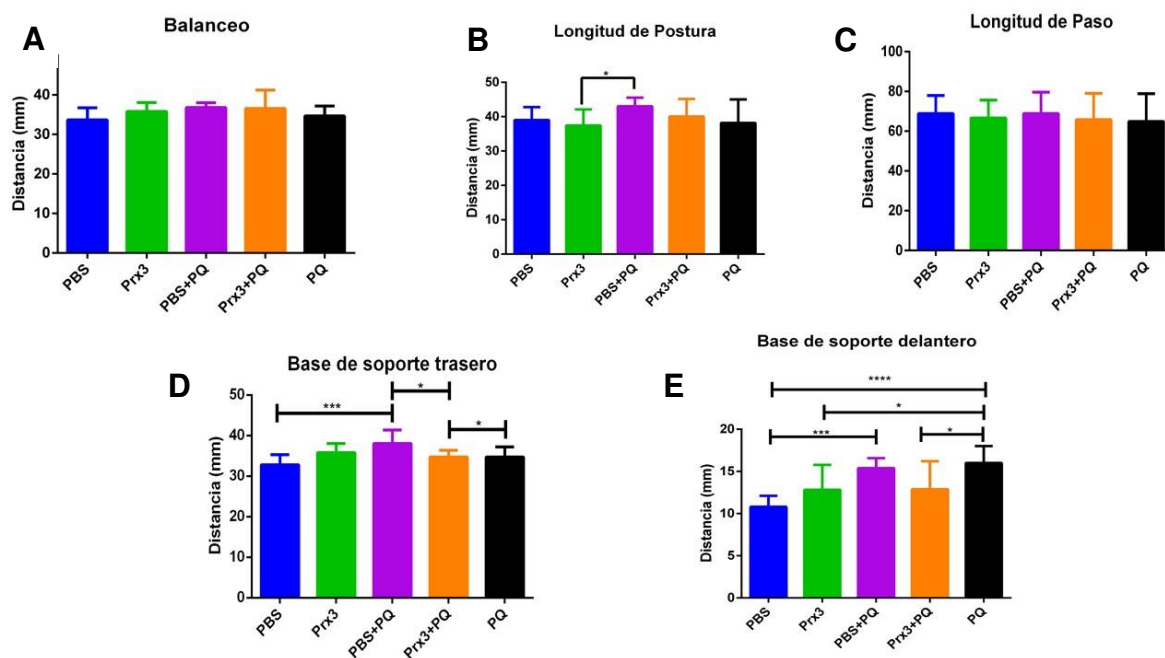


Figura 8. La sobreexpresión de PRX3 mejora la función motora en un modelo de la EP. A) No se observó diferencia significativa entre los grupos en la evaluación del balanceo, B) C) No se observó diferencia significativa entre los grupos en la evaluación de la longitud de la postura y la longitud del paso, D) E) Se observó diferencia significativa en los grupos a los que se les administró el tratamiento con PRX3+PQ en comparación con aquellos con PBS+PQ. Se considera patológico cuando la longitud entre las patas de soporte delanteras y traseras es mayor que en el grupo control. * $P < 0.005$, * $P < 0.001$, *** $P < 0.001$.

Otra prueba que utilizamos es la denominada “Prueba del poste” que se usa para evaluar el daño en neuronas dopaminérgicas, se evalúan dos tiempos, aquel que le toma al ratón girar sobre el poste y posicionarse para descender hacia la caja, y el tiempo que le toma bajar hasta la caja (Matsuura et al., 1997).

Se observó que, en el primer tiempo (T1), a aquellos ratones que les aplicamos el tratamiento con PRX3 les tomaba menor tiempo en iniciar la marcha y ponerse boca abajo, en comparación con aquellos a los que se les había inducido el modelo de EP con PQ (

Figura 9). Además, se observó una diferencia significativa entre el control de PBS intraperitoneal y el grupo PQ.

En cuanto al tiempo para descender el poste (T2) surgió un fenómeno ya descrito en la literatura, que aunque se observa que a los ratones inyectados con PRX3 les toma menos tiempo descender por el poste que a los ratones con PQ, no existe diferencia significativa entre los tiempos, esto puede deberse a que algunos de los ratones tratados con PQ en vez de descender caminando y sostenidos del poste, solían resbalarse debido al déficit motor ocasionado por el PQ, lo cual se traducía en menor tiempo para descender el poste.

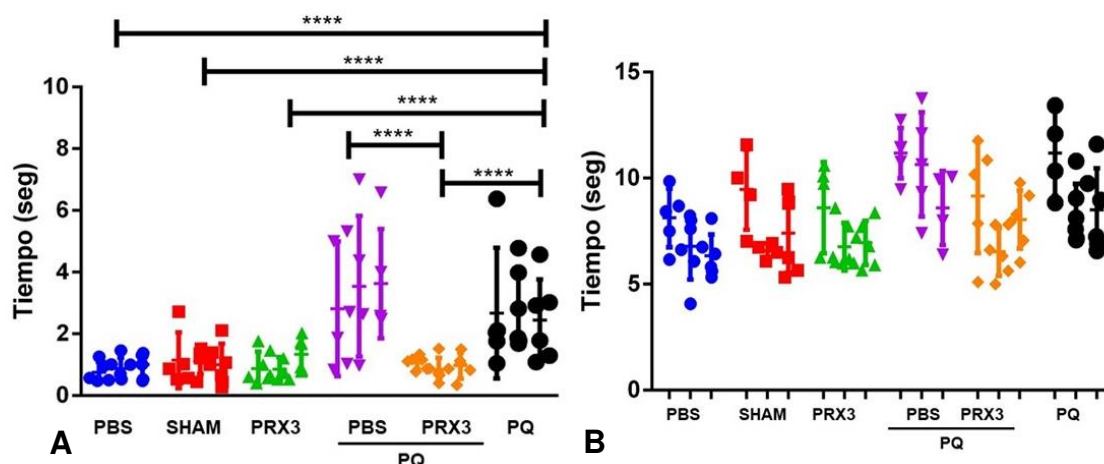


Figura 9. El complejo mejora el inicio de la marcha y la capacidad de orientación en los ratones.

A) Se observa diferencia significativa en el tiempo que les toma a los ratones girar y comenzar la marcha, entre los grupos a los cuales les aplicamos el tratamiento en comparación con aquellos que no, B) No se observa diferencia significativa entre el tiempo que les toma descender hacia la caja, esto debido que aquellos a los que se les indujo el modelo de EP y no se administró tratamiento con PRX3 solían bajar por el poste resbalándose y no caminando, debido al déficit motor.

La prueba que utilizamos para evaluar el déficit motor fino y cognitivo fue la prueba del “Adhesivo”, que consiste en colocar un círculo adhesivo de ¼’ en el hocico del ratón (Figura 10A), posterior al comienzo de la nariz, y se toma el tiempo que le toma al ratón en retirárselo, pudimos observar que existía diferencia significativa entre los grupos a los que les aplicamos el tratamiento con PRX3 y aquellos que no tenían tratamiento pero si tenían inducido el modelo de EP con PQ (Figura 10 B).

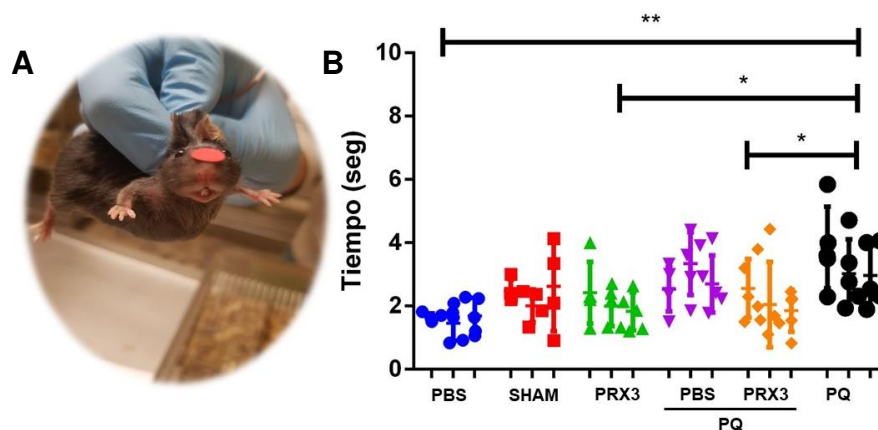


Figura 10. El complejo mejora la motilidad fina. A) Ratón con adhesivo. B) Diferencia significativa entre ratones con complejo y aquellos con PQ.

Para la evaluación de la función cognitiva y los movimientos espontáneos utilizamos la prueba del “Cilindro modificada” (Figura 11A) que consiste en introducir al ratón en un cilindro de cristal de 30 cm de altura y contar cuantas veces este se para sobre sus patas traseras y toca las delanteras la pared del cilindro, todo esto en un tiempo de 3 minutos. Observamos en los resultados que en aquellos a los que se les administró el complejo con PRX3 se encontraba preservada la motilidad fina (Figura 11B).

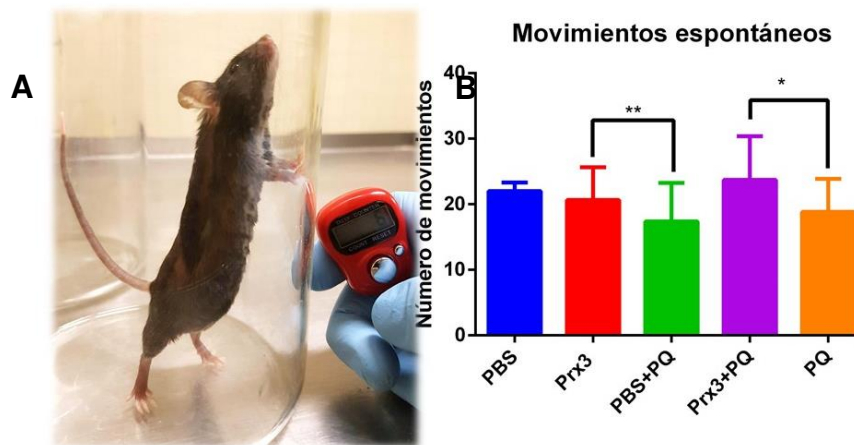


Figura 11. El complejo mejora la actividad espontánea. A) Ratón dentro del cilindro. B) Se observó un mayor número de movimientos espontáneos en aquellos ratones a los que se les administro el tratamiento con PRX3 en comparación con aquellos que no fueron tratados con este complejo y además se les indujo el modelo de EP con PQ.

10.5. PRX3 protege contra la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SN inducida por Paraquat.

La EP se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN *pars compacta* (SNps) en el mesencéfalo, lo que produce la sintomatología ya conocida y evaluada en nuestros experimentos (Sheila M. Fleming et al., 2013). Para fundamentar este déficit, nuestro modelo debe cumplir con esta característica. Para esto sacrificamos a los ratones en la 8va semana para posteriormente realizar cortes cerebrales a nivel de la SNpc. Después identificamos neuronas con fenotipo dopaminérgico utilizando el marcador característico tirosina hidroxilasa (TH), enzima responsable de catalizar la conversión de L-tirosina a DOPA, molécula precursora de la dopamina. En la **Figura 12** mostramos la detección de esta enzima en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Como control observamos el cerebro del ratón que fue tratado solamente con PBS intraperitoneal, y que no muestra lesión ocasionada por PQ. En contraste, en el grupo tratado con PQ, apreciamos una disminución en la población neuronal. Podemos observar que aquellos tratados con PRX3 y que además se les ha inducido el modelo de EP conservan una cantidad mayor de neuronas en comparación con aquellos a los que se trataron solo con PQ. En general, se aprecia mayor cantidad de neuronas en aquellos ratones en los que se utilizó PRX3 y una menor cantidad en aquellos que se ha inducido el modelo de EP.

Esto nos indica que existe una neuroprotección por parte de nuestro tratamiento al inhibir la muerte de estas neuronas. Esto a su vez fue analizado por intensidad de fluorescencia observando los mismos resultados (**Figura 13**).

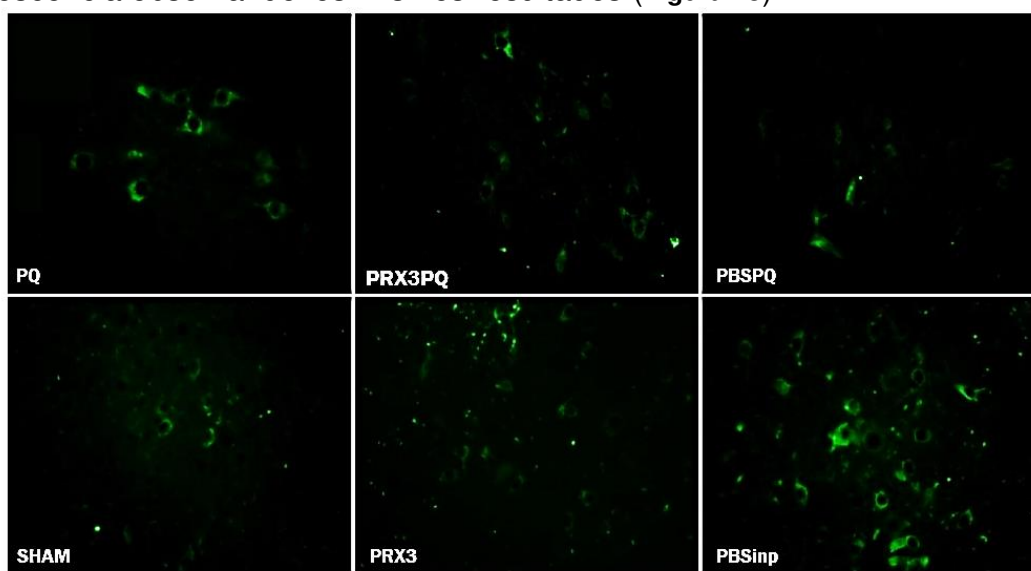


Figura 12. PRX3 evita la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SN. Detección de neuronas dopaminérgicas con anticuerpo anti-TH (verde).

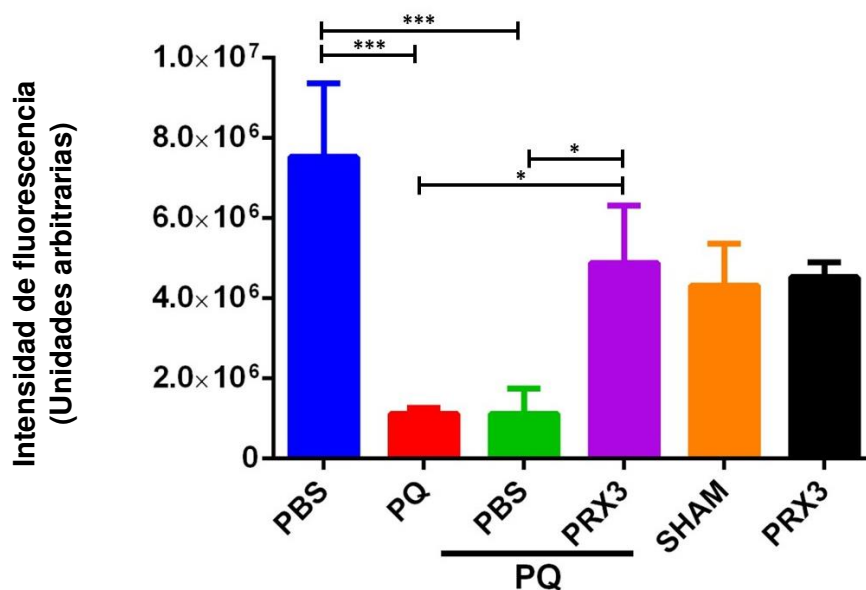


Figura 13. Análisis estadístico de fluorescencia. Análisis semicuantitativo de neuronas dopaminérgicas (TH positivas) por campos calculando la media de la intensidad de la fluorescencia. El análisis se realizó por medio del Software ImageJ.

11. Discusión

La EP resulta de distintos procesos que llevan a la muerte de neuronas dopaminérgicas, ocasionando la sintomatología característica (Lotharius & Brundin, 2002). Uno de estos procesos, estudiado ampliamente por nuestro grupo de trabajo es el estrés oxidativo, que provoca peroxidación lipídica, modificaciones irreversibles en la estructura de las proteínas y modificaciones en el ADN. Normalmente el estrés oxidativo es regulado por proteínas que mantienen la homeostasis de los sistemas redox como la Peroxirredoxina 3 (PRX3), que suele encontrarse en bajos niveles en regiones como la sustancia nigra, donde ocasiona la muerte a nivel celular (Goemaere & Knoop, 2012). Por esto, elegimos sobreexpresar el gen PRX3 en el cerebro en un modelo de la EP inducido con el pesticida Paraquat (PQ), el cual tiene propiedades neurotóxicas involucrando procesos de estrés oxidativo (Rappold et al., 2011).

Primero decidimos probar la transfección del vector pRP-EGFP- Prdx3[ORF030771] que incluye como gen reportero la proteína verde fluorescente. Para esto decidimos utilizar un sistema de entrega ya estandarizado en nuestro laboratorio (Villa-Cedillo, 2017; Yee-Chig, 2017), en el cual se aprovecha la característica neurotrófica del CPP RVG29, proveniente de la proteína del virus de la rabia, con alta afinidad para los receptores de acetilcolina, al intercambiar la Asn194 con Lys194 en el sitio de unión al neurotransmisor, lo que aumenta la capacidad de transfección celular del péptido (Villa-Cedillo et al., 2017).

Este sistema de entrega requiere de la unión de nuestro vector y el CPP por medio de cargas electrostáticas opuestas. El péptido RVG29m cuenta con cargas positivas debido a su alto contenido de argininas, por lo que se une (después de agitación constante) a nuestro vector, el cual es rico en cargas negativas (Villa-Cedillo, 2017; Yee-Chig, 2017).

Logramos demostrar la transfección del complejo RVGm-PRX3 en células con fenotipo dopaminérgico SH-SY5Y utilizando la relación 2:2 (PRX3:RVGm).

Después de comparar los resultados de transfección con aquellos realizados en el trabajo de *Villa-Cedillo en 2017*, decidimos evaluar el tratamiento con PRX3 en nuestro modelo animal de la EP.

En el primer experimento decidimos evaluar el parámetro más afectado durante la EP, la marcha. Para esto utilizamos el análisis de marcha, aquí se evalúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas al examinar la locomoción y la coordinación de las extremidades. En nuestro experimento, solamente dos parámetros demostraron ser significativos en comparación con el control positivo de PQ, aquellos que involucraban la apertura de patas traseras y delanteras. En estos parámetros, aquellos ratones tratados con PRX3 previo a la inducción del modelo de EP con PQ demostraron conservar la distancia entre patas traseras y la distancia entre patas delanteras, lo que se traduce en una disminución del balanceo al caminar, en comparación con aquellos a los que se les indujo el modelo animal de EP con PQ pero no se les administró el tratamiento.

Este análisis se ha realizado más comúnmente en ratas, en estos estudios se han encontrado los parámetros alterados de la marcha como la longitud del balanceo y la longitud entre pasos, a diferencia de nuestro estudio, esto puede deberse al tipo de agente neurotóxico utilizado o a que utilizamos ratones en vez de ratas. Estos estudios son muy útiles en modelos animales con problemas motores como derrames cerebrales y enfermedades neurodegenerativas (*Capoccia et al., 2015; Girirajan et al., 2008; Hetze, Römer, Teufelhart, Meisel, & Engel, 2012*).

Par evaluar el daño en la motricidad fina y el déficit cognitivo en modelos de EP existen baterías de experimentos que son muy útiles para esta tarea. Entre ellas se encuentra la publicada en el trabajo de (Sheila M. Fleming et al., 2013) del cual decidimos realizar las pruebas del poste, remoción de adhesivo y actividad espontánea en cilindro de cristal.

En la prueba del poste, existe una diferencia significativa en el tiempo que les toma orientarse hacia la caja (T1) en aquellos ratones del grupo PRX3+PQ en comparación con los ratones PQ y PBS+PQ. Para el segundo tiempo (T2) que es aquel que le toma a los ratones en descender la totalidad del poste después de haberse orientado, no existió diferencia significativa entre los grupos, que si ha sido menor el T2 que les toma a aquellos ratones del grupo PRX3+PQ en comparación con aquellos ratones del grupo PQ y PBS+PQ, en estos últimos se observó,

descendían por el poste resbalándose y sin una marcha continua, por lo que el T2 no resulta significativo. Este fenómeno lo reportó Matsuura (Matsuura et al., 1997) en donde ellos al resbalarse los ratones, brindaban un T2 de 120 segundos, nuestro grupo de trabajo decidió no brindar este puntaje puesto que nuestra cantidad de individuos de estudio era menor que la empleada por el grupo de Matsuura, pero de igual forma se observan resultados similares.

En la prueba de remoción de adhesivo, una prueba eficaz para valorar la motricidad fina de los ratones en modelos de EP, el reflejo de retirado del adhesivo implica correcta sensibilidad entre la pata del animal y su hocico y una destreza correcta (Bovet et al. 2009). En los ratones del grupo PRX3+PQ se observó una demora menor en el tiempo de retiro del adhesivo del hocico, en comparación con aquellos a los que se les indujo el modelo animal de EP con PQ, similar a lo documentado por Fleming y cols. en 2004, en donde los ratones inducidos con modelos de EP demoraban más que aquellos sanos.

Para la valoración de la función cognitiva de nuestro modelo de EP utilizamos la prueba de actividad espontánea en cilindro de cristal modificada, contando solamente la cantidad de veces que el ratón se paraba en sus patas traseras y tocaba la pared del cilindro con las patas delanteras, en la prueba original como la mostrada por Fleming (S. M. Fleming, 2004), se coloca al ratón en un cilindro de cristal y además se le coloca un espejo en la parte inferior del cilindro, de esta forma se puede videografiar los pasos y movimientos espontáneos que realiza, decidimos no realizar las pruebas que involucraban la medición de pasos puesto que ya teníamos una prueba bien estandarizada para eso. En esta prueba nuestros individuos tratados con PRX3, previo a la inducción del modelo de EP, demostraron mayor actividad espontánea al tocar más veces la pared del cilindro de cristal, en comparación con aquellos a los que se les indujo el modelo animal de EP con PQ pero no se les administró la PRX3. Nuestros resultados se relacionan con un estudio en el que utilizaron un modelo de EP inducido con MPTP, en donde los ratones tocaban menos veces el cilindro de cristal, además de contar con menos movimientos espontáneos, lo cual fue correlacionado con un menor número de neuronas dopaminérgicas (Bouet et al., 2009; S. M. Fleming, 2004).

Pudimos observar el claro deterioro motor y cognitivo en el modelo animal tratado con PQ debido a una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal íntimamente relacionada con los movimientos musculo-esqueléticos (Austin, Wendy & Boyd, M. (Mary Ann) & Austin, 2010; Fátima et al., 2015), además de una clara tendencia a la disminución de esta sintomatología en aquellos ratones tratados con PRX3 al igual que una preservación de la población neuronal en la sustancia nigra. Nuestros resultados concuerdan con la mejoría reportada en la literatura, en donde el restablecimiento y sobreexpresión de PRX3 a nivel cerebral, genera un aumento de defensas contra el daño causado por estrés oxidativo en otros modelos

experimentales (Angeles et al., 2011; Hattori et al., 2003), y en nuestro caso, contra el estrés oxidativo inducido por PQ.

12. Conclusiones

- A. El complejo RVGm-PRX3 es eficiente como vehículo para la entrega del gen PRX3 *in vitro* e *in vivo*.
- B. La PRX3 mejora la función motora y cognitiva en nuestro modelo animal de la Enfermedad de Parkinson.
- C. La PRX3 protege contra la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra inducida por paraquat.

13. Bibliografía

- Åmand, H. L., Fant, K., Nordén, B., & Esbjörner, E. K. (2008). Stimulated endocytosis in penetratin uptake: Effect of arginine and lysine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 621–625. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.04.039>
- Angeles, D. C., Gan, B. H., Onstead, L., Zhao, Y., Lim, K. L., Dachsel, J., ... Tan, E. K. (2011). Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Human Mutation*, 32(12), 1390–1397. <https://doi.org/10.1002/humu.21582>
- Austin, Wendy & Boyd, M. (Mary Ann) & Austin, W. (2010). *Psychiatric & mental health nursing for Canadian practice* (2nd ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., Divoux, D., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2009). The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nature Protocols*, 4, 1560. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.125>
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., Charrier, V., & Parsonage, D. (1999). Protein-Sulfenic Acids: Diverse Roles for an Unlikely Player in Enzyme Catalysis and Redox Regulation. *Biochemistry*, 38(47), 15407–15416. <https://doi.org/10.1021/bi992025k>
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425(2), 313–325. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>
- De Simoni, S., Goemaere, J., & Knoop, B. (2008). Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+. *Neuroscience Letters*, 433(3), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.068>
- Faber, M., Faber, M.-L., Papaneri, A., Bette, M., Weihe, E., Dietzschold, B., & Schnell, M. J. (2005). A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. *Journal of Virology*, 79(22), 14141–14148. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14141-14148.2005>
- Fátima, C.-A., Aldo, T.-M., Alejandro, E.-C., Hans Alam, S.-B., Eduardo, M.-L., & Raúl, G.-L. (2015). Modelos clásicos de inducción de Parkinson. *Revista ENeurobiología*, 1(613). Retrieved from www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/13/13.html
- Fleming, S. M. (2004). Early and Progressive Sensorimotor Anomalies in Mice Overexpressing Wild-Type Human α -Synuclein. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9434–9440. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3080-04.2004>
- Fleming, S. M., Ekhtor, O. R., & Ghisays, V. (2013). Assessment of Sensorimotor

- Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Visualized Experiments*, (76), 1–7. <https://doi.org/10.3791/50303>
- Fu, A., Wang, Y., Zhan, L., & Zhou, R. (2012). Targeted delivery of proteins into the central nervous system mediated by rabies virus glycoprotein-derived peptide. *Pharmaceutical Research*, 29(6), 1562–1569. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0667-y>
- Fu, A., Zhang, M., Gao, F., Xu, X., & Chen, Z. (2013). A Novel Peptide Delivers Plasmids across Blood-Brain Barrier into Neuronal Cells as a Single-Component Transfer Vector. *PLoS ONE*, 8(3), e59642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059642>
- Futaki, S. (2005). Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4), 547–558. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2004.10.009>
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>
- Gao, Y., Wang, Z.-Y., Zhang, J., Zhang, Y., Huo, H., Wang, T., ... Wang, S. (2014). RVG-Peptide-Linked Trimethylated Chitosan for Delivery of siRNA to the Brain. *Biomacromolecules*, 15(3), 1010–1018. <https://doi.org/10.1021/bm401906p>
- Goemaere, J., & Knoop, B. (2012). Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders. *Journal of Comparative Neurology*, 520(2), 258–280. <https://doi.org/10.1002/cne.22689>
- Green, M., & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein. *Cell*, 55(6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0)
- Hattori, F., Murayama, N., Noshita, T., & Oikawa, S. (2003). Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 86(4), 860–868. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01918.x>
- He, W., Goodkind, D., & Kowal, P. (2016). An Aging World: 2015 International Population Reports. *Aging*, (March), 165. <https://doi.org/P95/09-1>
- Heitz, F., Morris, M. C., & Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00057.x>
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K.-E., Hee Kim, M., Davidson, B. L., ...

- Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448, 39. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature05901>
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *The Lancet*, 373(9680), 2055–2066. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)
- Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J., & Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, 215(4529), 182 LP-184. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/215/4529/182.abstract>
- Li, L., Shoji, W., Takano, H., Nishimura, N., Aoki, Y., Takahashi, R., ... Obinata, M. (2007). Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(3), 715–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.022>
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 932. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn983>
- Marianne, van der M., Maartje, B., Hans, K., Peter, N., Anke, H., & Roel, V. (2012). Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environmental Health Perspectives*, 120(3), 340–347. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103881>
- Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H., & Ogawa, N. (1997). Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *Journal of Neuroscience Methods*, 73(1), 45–48. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)02211-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)02211-X)
- National-Parkinson-Foundation. (2017). Parkinson's Disease Overview. Retrieved from <http://www.parkinson.org/parkinson-s-disease.aspx>.
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 72(6), 893–901. <https://doi.org/10.1002/ana.23687>
- Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., van der Brug, M., ... Singleton, A. B. (2004). Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause *PARK8*-Linked Parkinson's Disease. *Neuron*, 44(4), 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.023>
- Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C. K., & Hong, J. T. (2016). Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 163, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.018>
- Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223–236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

- Phoolcharoen, W., Prehaud, C., Dolleweerd, C. J., Both, L., Costa, A., Lafon, M., & Ma, J. K.-C. (2017). Enhanced transport of plant-produced rabies single-chain antibody-RVG peptide fusion protein across an in cellulo blood–brain barrier device. *Plant Biotechnology Journal*, 15(10), 1331–1339. <https://doi.org/10.1111/pbi.12719>
- Rappold, P. M., Cui, M., Chesser, A. S., Tibbett, J., Grima, J. C., Duan, L., ... Tieu, K. (2011). Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20766 LP-20771. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/108/51/20766.abstract>
- Rohn, S., et al. (2012). RVG peptide as transfection reagent for specific cdk4 gene silencing in vitro and in vivo. *J Drug Target*, 4(20), 381–388.
- Son, S., Hwang, D. W., Singha, K., Jeong, J. H., Park, T. G., Lee, D. S., & Kim, W. J. (2011). RVG peptide tethered bioreducible polyethylenimine for gene delivery to brain. *Journal of Controlled Release*, 155(1), 18–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.011>
- Tomiyama, H., Mizuta, I., Li, Y., Funayama, M., Yoshino, H., Li, L., ... Hattori, N. (2008). LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *Journal Of Human Genetics*, 53, 1012. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s10038-008-0336-5>
- Uttara, B., Singh, A. V, Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Villa-Cedillo, S. A. (2017). *ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DEL PÉPTIDO RVG COMO VEHÍCULO PARA ENTREGA DE MOLÉCULAS DE DNA EN CEREBRO MURINO*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Villa-Cedillo, S. A., Rodríguez-Rocha, H., Zavala-Flores, L. M., Montes-de-Oca-Luna, R., García-García, A., Loera-Arias, M. de J., & Saucedo-Cárdenas, O. (2017). Asn194Lys mutation in RVG29 peptide increases GFP transgene delivery by endocytosis to neuroblastoma and astrocyte cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(10), 1352–1363. <https://doi.org/10.1111/jphp.12766>
- Villa-Cedillo SA, S.-C. O. (2017). Terapia génica con factores neurotróficos para enfermedades neurodegenerativas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32–40. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00003-8)
- Wu, S. P., Fu, A. L., Wang, Y. X., Yu, L. P., Jia, P. Y., Li, Q., ... Sun, M. J. (2006). A novel therapeutic approach to 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats via

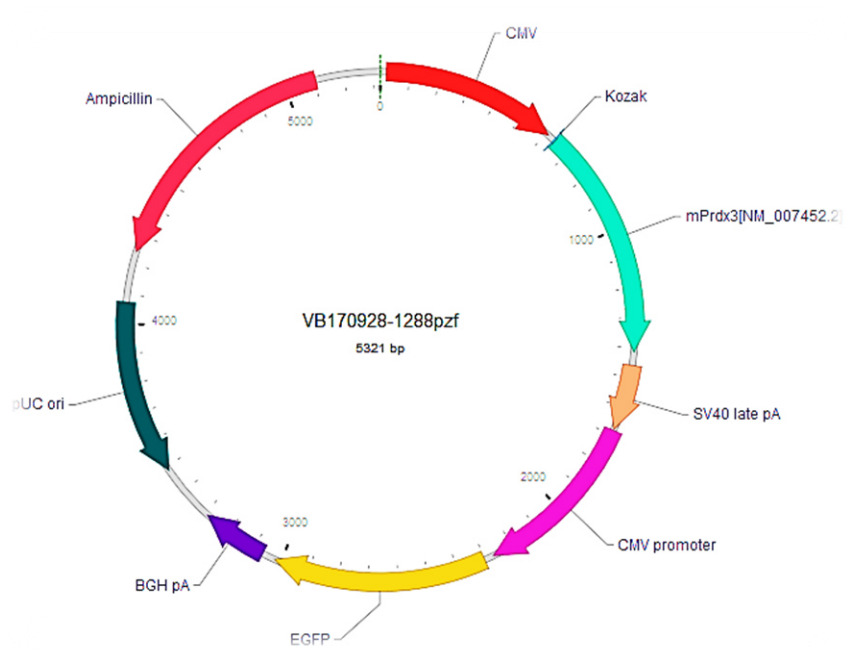
supplementation of PTD-conjugated tyrosine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.247>

Yacoubian, T. A. (2017). Neurodegenerative Disorders: Why Do We Need New Therapies? *Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802810-0.00001-5>

Yee-Chig, D. M. (2017). *Evaluación de la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDNF en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Zhang, D., Wang, J., & Xu, D. (2016). Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 229, 130–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.020>

Zhu, S., & Guo, C. (2016). Rabies Control and Treatment: From Prophylaxis to Strategies with Curative Potential. *Viruses*, 8(11), 279. <https://doi.org/10.3390/v8110279>



Anexo 1 Mapa del vector PRX3-GFP